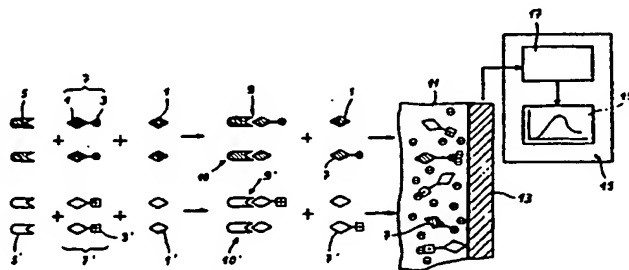




DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁵ : G01N 33/532, 33/536</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 93/25907 (43) Date de publication internationale: 23 décembre 1993 (23.12.93)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00561 (22) Date de dépôt international: 11 juin 1993 (11.06.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/07089 12 juin 1992 (12.06.92) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 15, rue Anatole-France, F-75700 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : DEGRAND, Chantal [FR/FR]; 6, rue Claude-Debussy, F-63670 Orcet (FR). BLANKESPOOR, Ronald [US/US]; 21 Woodcliff Av. S-E, Grand Rapids, MI 49506 (US). LIMOGES, Benoit [FR/FR]; 5, impasse Poncillon, F-63000 Clermont-Ferrand (FR). BROSSIER, Pierre [FR/FR]; 53, rue des Charrières, F-21800 Quetigny (FR).</p>		<p>(74) Mandataire: BREVATOME; 25, rue de Ponthieu, F-75008 Paris (FR). (81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>
<p>(54) Title: REDOX SYSTEM MARKED ANTIGEN, ELECTROCHEMICAL DETECTION IMMUNOASSAY AND ASSAY KIT</p>		
<p>(54) Titre: ANTIGÈNE MARQUÉ PAR UN SYSTÈME REDOX, PROCÉDE DE DOSAGE IMMUNOLOGIQUE AVEC DETECTION ELECTROCHIMIQUE ET KIT DE DOSAGE</p>		
<p>(57) Abstract</p>		
<p>Antigen marked by a redox system, process for the immunoassay of at least one antigen, and assay kit. The object of the invention is to provide a reliable multiassay homogenous phase process which is speedy, specific and capable of being automated. The object is attained by a process consisting in allowing at least one of the antigens to be assayed (1, 1') to compete with the same antigen (7, 7') marked by a redox system, one of the forms being ionic (3, 3'), against a specific antibody (5, 5') of said antigens (1, 7; 1', 7') present in limited quantity; gathering on an electrode (13), comprising a polyionic film (11) with a polarity opposite to that of the redox system (3, 3'), the marked antigens (7, 7') not bound to the specific antibody (5, 5'), so that said marked antigens (7, 7') become concentrated in said film (11); and measuring the amplified signal supplied by said electrode (13) using electrochemical detection means (15) connected to said electrode.</p>		
<p>(57) Abrégé</p>		
<p>L'invention concerne un antigène marqué par un système redox, un procédé de dosage immunologique d'au moins un antigène et un kit de dosage. Le but de l'invention est de réaliser un procédé de multidosage en phase homogène, rapide, fiable, spécifique et automatisable. Ce but est atteint à l'aide d'un procédé consistant à: mettre en compétition au moins l'un des antigènes à doser (1, 1') avec le même antigène (7, 7') marqué par un système redox dont l'une des formes est ionique (3, 3'), face à un anticorps (5, 5') spécifique desdits antigènes (1, 7; 1', 7') et présent en quantité limitée, collecter sur une électrode (13) comprenant un composé polyionique (11) de polarité contraire à celle du système redox (3, 3'), les antigènes marqués (7, 7') non liés à l'anticorps spécifique (5, 5'), de façon que ces antigènes marqués (7, 7') se concentrent dans ledit film (11), mesurer le signal amplifié fourni par ladite électrode (13) grâce à des moyens de détection électrochimique (15), reliés à cette électrode.</p>		



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brésil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CZ	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
DE	Allemagne	MC	Monaco	TG	Togo
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	MI	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	VN	Viet Nam

ANTIGENE MARQUE PAR UN SYSTEME REDOX,
PROCEDE DE DOSAGE IMMUNOLOGIQUE AVEC
DETECTION ELECTROCHIMIQUE ET KIT DE DOSAGE

5

DESCRIPTION

La présente invention concerne un antigène
marqué par un système redox dont l'une des formes est
ionique, un procédé de dosage immunologique avec
10 détection électrochimique d'au moins un antigène et
un kit de dosage d'au moins un antigène.

La consommation croissante de certains médi-
caments, de produits toxiques ou de drogues a conduit
à la mise au point de méthodes de détection précises,
15 spécifiques et rapides utilisées notamment dans les
hôpitaux et les laboratoires d'analyse. Ces méthodes
ont pour but de permettre un suivi thérapeutique de
médicaments prescrits au malade mais également d'ef-
fectuer des dosages en toxicologie d'urgence.

20 De nombreux médicaments comme les antidépres-
seurs, les anti-épileptiques, les tranquillisants et
les neuroleptiques sont administrés de façon régulière
à des patients. Toutefois, leur index thérapeutique,
(c'est-à-dire la gamme des valeurs comprises entre
25 leur seuil d'efficacité et leur seuil de toxicité)
est parfois extrêmement faible. A titre d'exemple,
dans le cas des antidépresseurs, il y a un risque d'in-
toxication dès que ce médicament dépasse une concentra-
tion de $2 \cdot 10^{-6} M$ dans le sérum. En conséquence, il
30 est nécessaire d'effectuer des prélèvements réguliers
sur les patients pour pouvoir doser et suivre l'évolu-
tion de la concentration du médicament dans les fluides
biologiques.

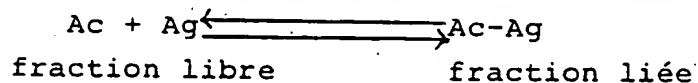
Par ailleurs, certains médicaments comme
35 les amphétamines ou les cardiotoniques peuvent être

utilisés à des fins de dopage. Il est important de pouvoir doser de façon fiable ces médicaments après une compétition sportive.

Enfin, certains patients peuvent ingérer
5 de façon volontaire ou accidentelle des médicaments ou produits toxiques. Lorsque ces patients arrivent dans un hôpital en état d'urgence, il est nécessaire d'effectuer des dosages très rapides et précis, afin de déterminer la nature du produit qu'ils ont absorbé
10 et de les soigner de façon appropriée.

De nombreuses méthodes de dosage, fiables et spécifiques se sont développées. Ces méthodes sont basées sur l'association d'un détecteur d'origine biologique, capable de se lier de façon spécifique avec
15 le médicament que l'on souhaite doser, d'un transducteur qui génère un signal représentatif de la liaison du détecteur et du médicament, et d'un analyseur qui transforme le signal obtenu en une information accessible à l'utilisateur.

20 Parmi les méthodes de dosage, les méthodes immunologiques permettent de doser de faibles quantités d'antigène. Elles sont basées sur le fait que des anticorps (Ac) reconnaissent puis se lient de manière spécifique aux antigènes (Ag), pour donner un complexe anti-
25 gène-anticorps selon la réaction équilibrée suivante :



L'introduction des marqueurs radioactifs en 1959, par les pionniers BERSON et YALOW, a connu
30 un succès considérable et a donné naissance à la radio-immunologie (RIA). Cette technique présente toutefois de sérieux inconvénients. Les traceurs radioactifs sont d'un prix élevé et d'une courte durée de vie. En outre, l'utilisation de matériel radioactif est
35 fortement réglementée et ne peut être faite que par

un laboratoire agréé par le CEA.

Pour éviter ces inconvénients, on a également essayé de mettre au point des marqueurs photosensibles dont la présence est détectée par absorption moléculaire (infrarouge ou fluorescence) ou atomique, infrarouge ou fluorescence. Toutefois, ces techniques nécessitent un appareillage sophistiqué de coût élevé.

Des techniques de dosage immuno-enzymatique sont connues d'après l'art antérieur sous le nom de Test ELISA (marque déposée). Certaines de ces techniques sont basées sur le principe dit du "dosage compétitif" qui consiste à introduire et à mettre en compétition une quantité définie d'antigènes marqués (par une enzyme) et une quantité non définie d'antigènes non marqués, face à une quantité limitée et connue d'anticorps. Dans les tests ELISA, la séparation des fractions libre et liée est réalisée par transfert du milieu réactionnel dans des tubes à essai ou des cupules, sur les parois desquels sont fixés des seconds anticorps spécifiques. Après la première réaction immunologique, des étapes de transfert, décantation et lavage sont opérées avant d'ajouter le substrat de l'enzyme. Celui-ci se colore ensuite dans un laps de temps plus ou moins long. L'intensité de la coloration est alors mesurée par des dosages de spectrophotométrie.

Toutefois, le marquage enzymatique des antigènes est délicat et d'une stabilité limitée. En outre, cette technique ne présente pas une très bonne spécificité, les résultats obtenus ne sont donc pas tout à fait fiables. Par ailleurs, des interférences peuvent inhiber l'activité de l'enzyme. Enfin, cette approche nécessite une étape de transfert pour séparer les fractions libre et liée, suivie de plusieurs lavages, donc un temps de manipulation long et coûteux. Cette ap-

proche est le propre des méthodes en phase hétérogène.

L'invention a pour objectif de s'affranchir de ces conditions et de ce fait, concerne notamment un procédé de dosage en phase homogène, plus simple et plus rapide.

Dans le domaine de l'immunologie, on connaît également d'après les demandes de brevet EP-0 142 301 et EP-0-167 248, des méthodes de dosage électrochimique utilisant des centres redox tels que le ferrocène, et une électrode de travail solide en carbone vitreux ou en métal. Dans les demandes citées, les centres redox peuvent éventuellement intervenir comme médiateurs de transfert d'électrons dans des réactions enzymatiques, ce qui permet une amplification du signal électrique et par conséquent une augmentation de la sensibilité de la méthode électrochimique.

On connaît également d'après la demande de brevet EP 241 309 une méthode de dosage de la théophylline avec détection électrochimique à l'aide d'un marqueur au ferrocène. La détection par coulométrie est amplifiée à l'aide d'une catalyse enzymatique et d'une électrode modifiée par un film de polyvinyl ferrocène dont le rôle est de servir de relais entre l'électrode et le médicament marqué (celui-ci ne pénètre pas dans le film).

Toutes ces techniques, outre leurs inconvénients spécifiques, ne permettent pas de doser simultanément plus de deux médicaments présents dans un échantillon biologique. Or, il serait souhaitable lorsqu'un patient arrive en état d'urgence, de pouvoir effectuer un unique multi-dosage de plusieurs médicaments employés couramment et avec lesquels les risques d'intoxication sont fréquents.

L'invention a également pour objectif de remédier aux inconvénients précités.

A cet effet, l'invention concerne un antigène marqué par un système redox dont l'une des formes est ionique, destiné à être utilisé dans un procédé de dosage immunologique avec détection électrochimique, de cet antigène, ou dans un kit de dosage immunologique de cet antigène.

Selon les caractéristiques de l'invention, cet antigène marqué est choisi parmi la nortriptyline marquée à l'hexafluorophosphate de l'acide carboxylique du cobalticinium, au pyrrolidinyloxy ou au dibromure d'éthyl alkyl viologène ; l'amphétamine marquée au tétrafluoroborate de l'acide carboxylique du cobalticinium ou au pyrrolidinyloxy ; la désipramine marquée à l'hexafluorophosphate de l'acide carboxylique du cobalticinium, au pyrrolidinyloxy ou au dibromure d'éthyl alkyl viologène ; ou la biotine marquée au tétraphénylborate de l'acide carboxylique du cobalticinium.

Ces antigènes marqués spécifiques ont été mis au point lors de la réalisation de procédés ou de kits de dosage immunologiques et donnent des résultats particulièrement intéressants, comme cela sera expliqué ultérieurement.

L'invention concerne également un procédé de dosage immunologique avec détection électrochimique, d'au moins un antigène comprenant au moins un groupement fonctionnel. Ce procédé comprend les étapes consistant à :

- préparer une solution à analyser comprenant une solution aqueuse tamponnée au pH physiologique, (de préférence pH 7,4) et un échantillon biologique contenant au moins l'un des antigènes à doser,

- mettre en compétition au moins l'un desdits antigènes à doser avec le même antigène marqué par un système redox dont l'une des formes est ionique (et de préférence cationique ou procationique), face

à un anticorps spécifique desdits antigènes et présent en quantité limitée.

Selon les caractéristiques de l'invention, ce procédé consiste ensuite à :

5 - collecter sur une électrode comprenant un composé polyionique de polarité contraire à celle du système redox, (c'est-à-dire de préférence, polyanionique), les antigènes marqués, non liés à l'anticorps spécifique, de façon que ces antigènes
10 marqués se concentrent dans ledit composé pendant une période d'accumulation,

 - mesurer le signal fourni par ladite électrode, à l'issue de la période d'accumulation, grâce à des moyens de détection électrochimique, reliés à
15 cette électrode.

Un système redox "pro-ionique" est un système dont l'une des formes devient ionique par oxydation anodique (système redox "procationique") ou par réduction cathodique (système redox "pro-anionique").

20 De préférence, l'électrode est revêtue d'un film polyionique. Selon une variation de réalisation, ce film polyionique est polyanionique et comprend un polymère perfluoré porteur de sites anioniques au pH physiologique.

25 Ce film présente ainsi un caractère à la fois hydrophobe et ionique.

 Ce procédé permet de réaliser très rapidement des mesures sélectives et avec une bonne sensibilité due, d'une part, à l'emploi d'anticorps spécifiques
30 et d'autre part, aux caractéristiques de l'électrode modifiée. Celle-ci est capable de concentrer les antigènes marqués même s'ils ne sont présents qu'en très faibles quantités à l'intérieur de la solution analytique, ce qui a pour effet d'amplifier le signal avant
35 qu'il ne soit transmis aux moyens électrochimiques de détection. En outre, ce procédé est très simple à employer et d'un faible coût car l'appareillage utilisé est extrêmement simplifié. Ces deux caractéris-

tiques justifient l'utilisation de ce procédé non seulement dans les milieux médicaux, mais également en milieu vétérinaire ou agricole, pour doser des pesticides par exemple. De plus, ce procédé est facilement automatisable du fait du nombre très réduit de manipulations à effectuer.

L'antigène dosé par ce procédé est une molécule comprenant au moins un groupement fonctionnel, de préférence une fonction amine primaire ou secondaire ou une fonction carboxylique. Ceci ouvre un large champ de possibilités parmi les substances, pesticides ou médicaments que l'on peut doser par ce procédé.

De façon avantageuse, les moyens de détection électrochimiques sont choisis parmi l'ampérométrie, la coulométrie, la voltampérométrie, et de préférence, la voltammétrie à vague carrée.

Ces moyens de détection permettent de réaliser rapidement et de façon fiable les mesures, y compris en milieu trouble, comme c'est le cas lorsque l'échantillon biologique de l'analyte est un sérum par exemple. Ceci présente un avantage par rapport aux méthodes spectroscopiques utilisées fréquemment dans les dosages immunologiques.

Le système redox peut être tout système correspondant à un échange électronique rapide aux pH physiologiques (voisins de 7,4).

De préférence, le système redox de marquage est choisi parmi les dérivés du ferrocène, du cobalticinium, du pyrrolidinyloxy ou du viologène.

Ces différents systèmes de marqueurs redox sont cationiques ou procationiques. Les systèmes cationiques sont déjà cationiques au départ, c'est le cas des dérivés du cobalticinium et du viologène, tandis que les systèmes procationiques sont neutres au départ et deviennent cationiques lorsque, après avoir pénétré

dans le film anionique, ils sont oxydés anodiquement par polarisation de l'électrode ; c'est le cas des dérivés du ferrocène et du pyrrolidinyloxy. En outre, ces systèmes de marquage possèdent des potentiels standard redox très différents conduisant à des signaux électriques bien individualisés. En conséquence, on peut envisager un multidosage, dans lequel chacun des antigènes que l'on souhaite doser est marqué avec un marqueur redox agissant à un potentiel différent.

L'invention concerne également un kit de dosage immunologique d'au moins un antigène comprenant au moins un groupement fonctionnel. Selon les caractéristiques de l'invention, ce kit comprend :

- au moins un support ou un contenant possédant au moins un type de complexe anticorps-antigène marqué par un système redox dont l'une des formes est ionique, l'antigène correspondant à celui que l'on souhaite doser, et

- une électrode comprenant un composé polyionique de polarité contraire à celle dudit système redox.

Il s'agit généralement d'un film polyionique.

L'invention dans son ensemble sera mieux comprise à la lecture de la description suivante d'un mode de réalisation spécifique de l'invention, donné à titre d'exemple illustratif et non limitatif, cette description étant faite en faisant référence aux dessins joints, dans lesquels :

- la figure 1 est un schéma illustrant les diverses étapes du procédé de dosage immunologique selon l'invention,

- la figure 2 est une vue en coupe de la cellule et de l'électrode utilisées dans le procédé de dosage,

- la figure 3 représente un exemple théorique de courbe obtenue par voltammétrie à vague carrée,

- la figure 4 représente deux courbes obtenues

par voltamétrie à vague carrée, respectivement avec une électrode nue en carbone vitreux et avec une électrode modifiée selon l'invention,

5 - la figure 5 est une courbe illustrant sur une échelle logarithmique, l'évolution de l'intensité en fonction de la concentration d'un analyte contenant comme antigène marqué seul, l'amphétamine marquée au cobalticinium,

10 - la figure 6 est un graphique représentant l'interférence éventuelle des antigènes non marqués sur le pourcentage de signal électrique que fournit l'antigène marqué,

15 - la figure 7 est un graphique illustrant l'influence du sérum normal sur l'accumulation de l'antigène marqué, à l'intérieur du film de l'électrode,

- la figure 8 est une courbe illustrant le pourcentage de signal électrique fourni par la désipramine marquée au cobalticinium en fonction de la concentration en anticorps spécifique de la désipramine,

20 - la figure 9 est un graphique représentant des résultats de voltammétrie à vague carrée obtenus lors d'un dosage test,

- la figure 10 est une courbe d'étalonnage obtenue pour la désipramine modifiée dosée avec la désipramine marquée au cobalticinium,

25 - la figure 11 est une courbe représentant la mesure simultanée par voltammétrie à vague carrée de deux antigènes marqués et d'un traceur (cas d'un multidosage), et

30 - la figure 12 est un schéma illustrant les divers éléments présents dans le kit de dosage selon l'invention et les réactions immunologiques se déroulant lors de son utilisation.

35 Comme illustré en figure 1, le procédé de dosage selon l'invention consiste à mettre en compé-

5 titution au moins un antigène à doser 1 avec le même antigène marqué par un système redox 3 cationique ou procationique, face à un anticorps 5 spécifique dudit antigène 1 et présent en quantité limitée. L'antigène 1 marqué par le système redox 3 porte la référence globale 7.

Les affinités de l'anticorps 5 pour les antigènes 1 et 7 sont voisines. Enfin, les quantités d'antigènes marqués 7 et d'anticorps 5 sont connues.

10 Lors de l'immunoréaction, les antigènes marqués 7 réagissent avec les anticorps spécifiques 5 de façon à former des complexes 9 et respectivement les antigènes 1 et les anticorps 5 forment des complexes 10. Compte tenu de la quantité limitée d'anticorps 15 5, tous les antigènes 1 ou 7 ne peuvent pas réagir avec les anticorps 5, et certains d'entre eux restent à l'état libre. Parmi ceux-ci toutefois, seuls les antigènes marqués 7 pourront pénétrer à l'intérieur d'un film polyanionique 11 qui recouvre la surface 20 d'une électrode 13 constituée d'un cylindre de carbone vitreux. Par contre, les complexes 9 anticorps-antigène marqué ne pourront pas s'accumuler dans le film polyanionique 11, en raison de leur taille et de leur masse moléculaire. Ceci permet d'effectuer une sélection 25 et donc des mesures fiables.

On notera que l'électrode 13 recouverte du film polyanionique 11 pourrait être remplacée par une électrode en pâte de carbone dans laquelle le composé polyanionique serait noyé. Cette variante n'est pas 30 représentée sur les figures et dans la description, seule la première variante utilisant le film polyanionique est décrite en détail.

L'accumulation des antigènes marqués 7 à l'intérieur du film polyanionique 11 permet d'amplifier le signal observé à la sortie de l'électrode 13. 35 Cette électrode 13 est en effet reliée à des moyens de détection électrochimique 15 permettant l'inter-

prétation de ce signal. Ces moyens de détection 15 comprennent par exemple, un dispositif de mesure ampérométrique, coulométrique ou voltammétrique 17 qui sera détaillé ultérieurement, ce dernier étant relié
5 à un appareil pour tracer des graphes 19 fournissant des courbes de résultats.

Dans le mode de réalisation de l'invention qui vient d'être décrit, le film 11 est anionique et le système de marquage 3 est cationique ou
10 procationique, toutefois il est bien évident que l'inverse pourrait également être réalisé sans nuire au fonctionnement de l'invention.

Les diverses étapes de ce procédé et les moyens mis en oeuvre pour le réaliser vont maintenant
15 être décrits plus en détail.

Comme cela a été expliqué précédemment, le procédé de dosage selon l'invention permet de doser des antigènes, et plus spécifiquement des médicaments pour lesquels il est nécessaire de faire, soit un suivi
20 thérapeutique, c'est-à-dire d'en déterminer à intervalles réguliers la quantité présente dans un échantillon biologique, soit un dosage en toxicologie d'urgence, c'est-à-dire d'en déterminer la présence ou l'absence dans un prélèvement effectué sur un malade arrivant
25 à l'hôpital.

Ces antigènes, pour pouvoir être marqués avec l'un des systèmes redox cationique ou procationique 3 qui seront décrits ultérieurement, doivent présenter au moins un groupement fonctionnel et de
30 préférence, une fonction amine primaire ou secondaire ou une fonction carboxylique. En outre, ils doivent être constitués par des molécules suffisamment petites pour être en mesure de pénétrer dans le film.

Parmi les médicaments répondant à ces caractéristiques et qui peuvent être dosés avec le procédé selon l'invention, on citera notamment :

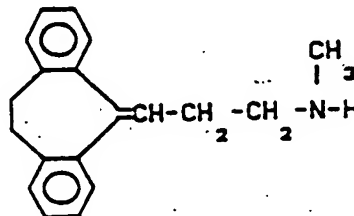
- les antidépresseurs tricycliques tels que

la désipramine, l'imipramine, la nortriptyline, l'amitriptyline, la clomipramine, la maprotiline et atypiques tels que la nomifensine, la miansérine, l'amineptine, la zimélidine,

- 5 - les antiépileptiques tels que les dérivés des barbituriques, notamment le phénobarbital, le méphobarbital, ou tels que les hydantoïnes, notamment la phénytoïne, la méphénytoïne, la carbamazépine et l'acide valproïque,
- 10 - les tranquillisants dérivés des benzodiazépines, notamment le diazépam, le nitrazépam,
- les neuroleptiques tricycliques tels que la chlorpromazine et la trifluopérazine,
- les neuroleptiques tels que l'halopéridol,
- 15 le fluospirilène,
- les antitumoraux tels que le méthotrexate, le 5-fluoro-uracile et l'azathioprine,
- les vitamines telles que la biotine,
- les alcaloïdes,
- 20 - les amphétamines;
- les antibiotiques,
- les cardiotoniques et les antiarythmiques,
- les neurotransmetteurs et leurs dérivés,
- les antihistaminiques,
- 25 - les immunosuppresseurs telle la cyclosporine,
- la théophylline, ou
- les pesticides.

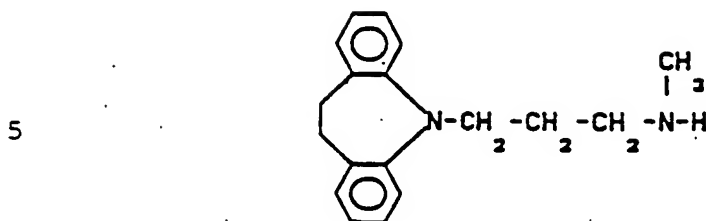
30 Parmi ceux-ci, on donne ci-après la formule chimique de :

- la nortriptyline :

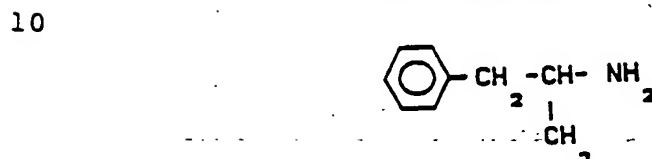


13

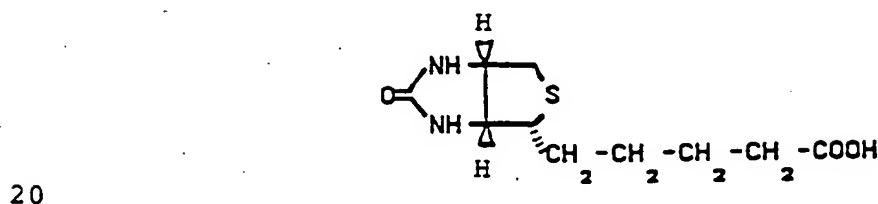
- la désipramine :



- l'amphétamine :



- la biotine:



Comme cela a été expliqué précédemment, pour que la réaction immunologique qui a été décrite en figure 1 se déroule correctement, il est nécessaire
25 que le système de marquage redox 3 ne perturbe pas la reconnaissance par l'anticorps 5, de l'antigène marqué 7.

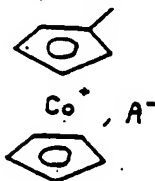
Les systèmes de marquage répondant à ces impératifs et susceptibles de se lier avec une substance
30 ou un médicament présentant au moins un groupement fonctionnel et notamment une fonction amine primaire ou secondaire ou une fonction carboxylique, sont choisis parmi les dérivés des couples :

- ferrocène/ferricinium (Fc/Fc^+) :



14

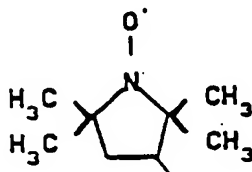
- cobalticinium/cobaltocène (Cc^+/Cc) :



5

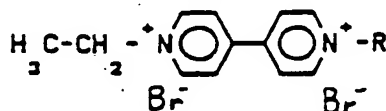
- pyrrolidinyloxy/pyrrolidinyloxonium

($NO\cdot/NO^+$) :



10

- éthyl alkyl viologène (sous forme de
15 dibromure) /radical viologène ($EV^{2+}/EV\cdot^+$) :



20

et leurs dérivés.

Parmi ces dérivés, on pourra citer par exemple des sels tels que l'hexafluorophosphate, le tétra-
phénylborate ou le tétrafluoroborate de l'acide carboxy-
25 lique du cobalticinium.

Le tableau 1 figurant ci-après illustre quatre
exemples de médicaments qui ont été marqués avec cer-
tains des différents systèmes redox de marquage poten-
tiels. Les médicaments marqués obtenus sont numérotés
30 de 1 à 10. Le tableau donne également l'analyse élémen-
taire de ces médicaments marqués.

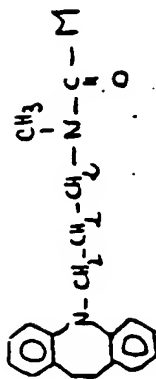
35

Tableau 1 : Les composés préparés et leur analyse élémentaire

Médicament marqué	Système de marquage : M	N°	Analyse Élémentaire Calculé (Trouvé) Formule
- nortriptyline marquée : 	Cc ⁺ ; PF ₆ ⁻	1	C, 57,80 (57,76) ; H, 4,69 (4,76) ; Co, 9,45 (9,80) ; F, 18,29 (17,99) ; N, 2,25 (2,27) ; P, 4,96 (5,16). [C ₃₀ H ₂₉ CoF ₆ NOP]
	NO [•]	2	C, 77,92 (78,07) ; H, 8,17 (8,22) ; N, 6,49 (6,42). [C ₂₈ H ₃₅ N ₂ O ₂]
	EV ²⁺ ; 2 Br ⁻	3	C, 62,99 (62,46) ; H, 6,14 (6,45) ; Br, 22,65 (22,28) ; N, 5,96 (5,91). [C ₃₇ H ₄₃ Br ₂ N ₃ O]
- amphétamine marquée : 	Pc	4	F = 160°C (Lavastre, Besançon, Brossier, Moise, App. Organomet. Chem. 1991, 5, 143).
	Cc ⁺ ; BF ₄ ⁻	5	C, 54,95 (54,92) ; H, 4,84 (4,87) ; B, 2,47 (2,28) ; Co, 13,48 (13,49) ; N, 3,20 (3,37). [C ₂₀ H ₂₁ BCoF ₄ N ₂ O]
	NO [•]	6	C, 71,25 (70,94) ; H, 8,97 (8,84) ; N, 9,23 (9,15). [C ₁₈ H ₂₇ N ₂ O ₂]

(Suite tableau 1)

- désipramine marquée :

Cc⁺ ; PF₆⁻7C, 55,60 (56,05) ; H, 4,83 (4,76) ; Co, 9,41 (9,35) ; F, 18,20 (17,62) ; N, 4,47 (4,69) ; P, 4,94 (5,16).
[C₂₉H₃₀CoF₆N₂OP]NO[•]8C, 74,62 (75,35) ; H, 8,35 (8,44) ; N, 9,67 (9,57). [C₂₇H₃₆N₃O₂]EV²⁺ ; 2 Br⁻9C, 61,02 (60,05) ; H, 6,26 (6,39) ; Br, 22,55 (22,23), N, 7,91 (7,82).
[C₃₆H₄₄Br₂N₄O]

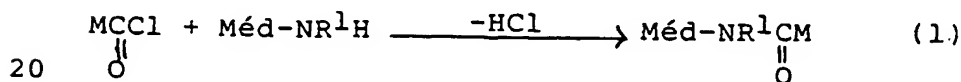
- biotine marquée :

-NH-NH-C-Cc⁺; BPh₄⁻10C, 68,18 (67,55) ; H, 5,85 (6,05) ; B, 1,36 (1,45) ; Co, 7,43 (6,96) ; N, 7,07 (6,81) ; S, 4,04 (3,68). [C₄₅H₄₆BCoN₄O₃S]

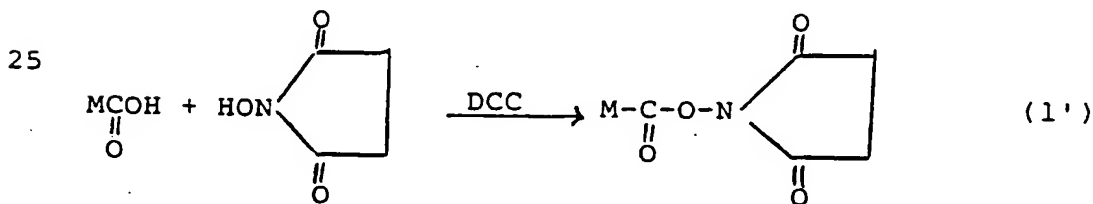
Les antigènes marqués n° 1 à 3 et 5 à 10 ont été mis au point lors de la réalisation du procédé de dosage et sont également particulièrement adaptés au kit de dosage décrit ultérieurement.

5 Le procédé de marquage des médicaments par l'un des systèmes redox précités est réalisé de la façon suivante.

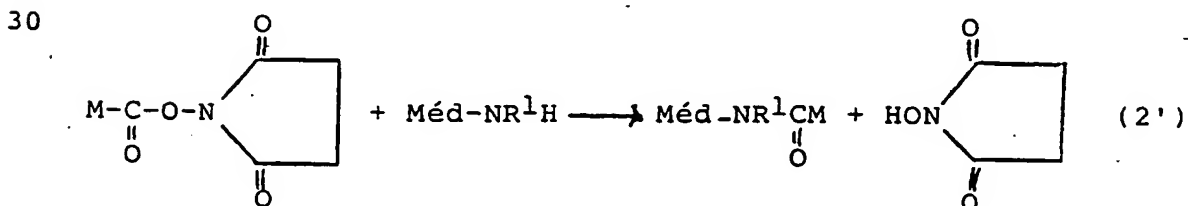
Les médicaments présentant une fonction amine primaire ou secondaire peuvent être symbolisés par la formule Med-NR¹H, tandis que le système de marquage redox M se présente sous forme de chlorure d'acide ou d'ester d'hydroxysuccinimide. En l'occurrence, le
10 procédé de marquage peut s'effectuer selon la réaction (1) (qui a servi à préparer les médicaments marqués 1, 5 et 7 du tableau 1) ou selon les deux réactions (1') et (2') (qui ont servi à préparer les médicaments 2, 4, 6 et 8 du tableau 1) :



ou

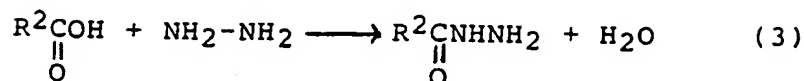


où DCC est le dicyclohexylcarbodiimide



35

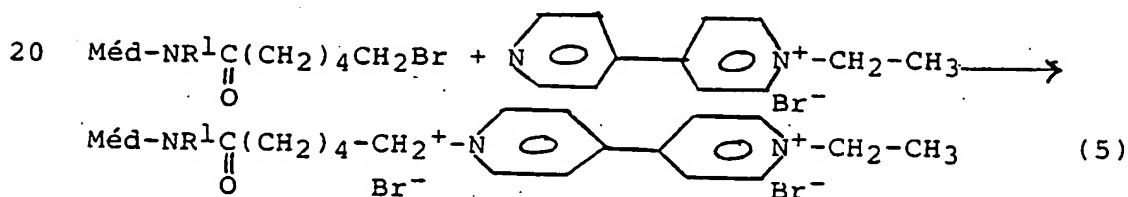
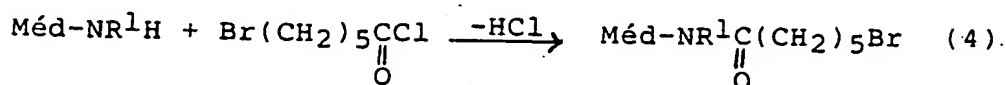
Les médicaments présentant une fonction carboxylique peuvent être symbolisés par la formule R^2COOH . Ils sont préalablement traités avec l'hydrazine NH_2-NH_2 selon la réaction (3) et l'hydrazine ainsi obtenue réagit avec un chlorure d'acide selon la réaction (1) précédente :



10

Cette réaction a servi à marquer le médicament 10 du tableau 1.

Enfin, le marquage au viologène s'effectue en deux étapes (4) et (5) qui ont permis de préparer les médicaments 3 et 9 du tableau 1 :



La figure 2 illustre la structure de la cellule dans laquelle sont effectuées l'accumulation sur l'électrode modifiée 13 puis la mesure ampérométrique après que la réaction antigène-anticorps ait eu lieu.

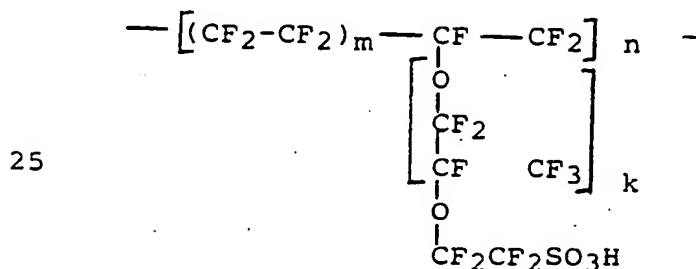
Cette cellule se compose par exemple d'un réservoir central 21 d'un diamètre interne de 13 mm, à l'intérieur duquel on dépose 0,5 à 1 ml de solution à analyser 23 contenant l'échantillon biologique à analyser (sérum, urine, etc...) dilué dans un tampon pH 7,4. Cet échantillon est généralement présent en une quantité de quelques dizaines de microlitres. Le

réservoir 21 comprend en outre deux tubulures latérales 24 dans lesquelles sont disposées une contre-électrode en fil de platine 25 et une électrode de référence Ag/AgCl 27. L'électrode 13 en carbone vitreux recouverte d'une couche du film polymère anionique 11 et sur laquelle a lieu la réaction de l'invention est plongée dans le réservoir 21.

Le cylindre de carbone vitreux 13 à usage unique est placé dans un manchon 29 de Téflon (marque déposée). Cet ensemble est fixé sur une électrode tournante 31 Tacussel type EDI 101T. Le contact entre le cylindre de carbone 13 et les conducteurs électriques 33 de l'électrode 31 est assuré par un ressort 35.

Du fait de la nature cationique des marqueurs, le film de polymère sera de nature polyanionique.

De façon avantageuse, ce polymère est un polymère perfluoré auquel sont greffés des groupements acide sulfonique. Il est connu sous le nom de marque Nafion (fabriqué par E.I. DUPONT DE NEMOURS), et présente la formule chimique suivante :



dans laquelle, m est compris entre 5 et 13,5, n vaut environ 1000 et k est un entier compris entre 1 et 3. De préférence, le polymère utilisé a une masse de 1100 g par mole de site SO₃H. A pH 7,4, il est sous forme polyanionique.

L'électrode sera fabriquée de façon à présenter des résultats reproductibles, à partir d'une solu-

tion de Nafion 117 commercialisée par la Société Aldrich, (référence 27, 470-4).

Ce polymère est thermiquement et chimiquement très stable, insoluble dans l'eau seule et donc dans les analytes. Il présente de bonnes propriétés de transport ionique. Les groupements fluorés assurent le caractère hydrophobe et les groupements SO_3^- , le caractère ionique du polymère.

Sur la figure 1, les antigènes marqués 7 peuvent se fixer, via un échange ionique, soit à la surface du film 11, soit en profondeur, après que la réaction immunologique ait eu lieu. L'électrode modifiée 13 est plongée dans la solution 23 (voir figure 2) et ce pendant une durée déterminée, dite "durée d'accumulation", de façon que les antigènes marqués 7 aient le temps de se concentrer dans le film 11 et que l'électrode 13 puisse ainsi fournir un signal amplifié, au moyen électrochimique de détection 15. Pendant cette période d'accumulation, l'électrode 13 est maintenue en circuit ouvert lorsque le marqueur est cationique (cobalticinium et viologène, par exemple) ou à un potentiel anodique constant pour les marqueurs procationiques (ferrocène et pyrrolidinyloxy, par exemple). En outre, de façon avantageuse, l'électrode modifiée est animée d'un mouvement de rotation de façon à faciliter le cheminement des antigènes marqués 7 vers le film 11. Puis, on interrompt la rotation pour effectuer la mesure électrochimique.

Il faut cependant noter qu'une fois la mesure effectuée, le polymère est pollué par l'antigène marqué et qu'il ne peut plus être utilisé pour une nouvelle mesure. Il est donc nécessaire de remplacer le cylindre de carbone 13 recouvert du film 11, à chaque mesure.

Comme décrit précédemment, les moyens électrochimiques de détection 15 comprennent un

dispositif de mesure 17 qui peut être un appareil de mesures par ampérométrie, par coulométrie ou voltampérométrie, et de façon avantageuse, par voltammétrie à vague carrée.

5 La voltammétrie à vague carrée utilise la contre-électrode 25, l'électrode de référence 27 et l'électrode de travail 13 modifiée par un film de Nafion, illustrées à la figure 2.

10 Comme illustré en figure 3, la voltammétrie à vague carrée consiste à effectuer un balayage en tension entre l'électrode de référence 27 et l'électrode modifiée 13. On obtient des pics d'intensité A dont on mesure la valeur maximale H.

15 Afin de montrer l'efficacité du film de Nafion, on a effectué un test comparatif entre une électrode recouverte d'un film de Nafion et une électrode en carbone vitreux nu (voir figure 4).

20 Des mesures de voltamétrie à vague carrée ont été effectuées avec une concentration connue ($0,9 \cdot 10^{-6}$ M) en amphétamine marquée au cobalticinium, seule, en solution. Sur la figure 4 jointe, la courbe C1 illustre les résultats obtenus avec une électrode en carbone vitreux nu et la courbe C2, les résultats obtenus par une électrode recouverte d'un film de Nafion, après accumulation pendant 5 minutes. La valeur du courant de pic de la courbe C1 est de 1,5 uA tandis que la valeur du pic de la courbe C2 est de 63,05 uA.

25 On peut donc constater que pour une concentration identique de produits présents dans un échantillon, l'électrode recouverte du film de Nafion permet d'amplifier le signal d'environ 40 fois, dans ce cas. La sensibilité des résultats est donc grandement améliorée par la présence du film de Nafion, qui permet en outre de détecter des quantités extrêmement faible de produits
35 présents dans l'échantillon initial.

Pour réaliser le procédé selon l'invention, l'une des étapes préliminaires consiste à effectuer une courbe d'étalonnage du médicament marqué, seul en solution et de mesurer les différents courants de pics obtenus en fonction de concentrations croissantes connues de médicament marqué. La figure 5 est une courbe d'étalonnage obtenue pour l'amphétamine marquée au cobalticinium, seule, dans un tampon pH 7,4, pour un temps d'accumulation de 5 minutes et une vitesse de rotation de l'électrode de 600 tours/minutes. Cette courbe montre que le domaine de linéarité est important (échelle logarithmique).

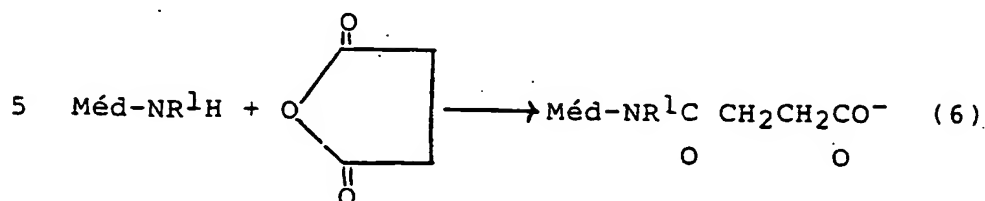
Divers tests ont été effectués afin de prouver l'efficacité du procédé selon l'invention.

15 Test d'interaction antigène marqué/antigène non marqué

Dans les conditions de l'immunodosage, c'est-à-dire à pH 7,4, la couche 11 de polymère de Nafion est en mesure d'accumuler, non seulement les antigènes 7 marqués par un système redox 3 cationique ou procationique, mais éventuellement aussi la forme protonée des antigènes 1 lorsque ceux-ci correspondent à la formule Méd-NR¹H. Des tests effectués sur l'amphétamine ont montré que le signal produit par l'amphétamine marquée 7 n'est pas modifié par l'apport croissant d'amphétamine 1 seule. En revanche, on a pu constater, dans le cas de la nortriptyline et de la désipramine, que cette interférence entraînait une diminution du signal électrique observé à la sortie de l'électrode 13.

30 Compte tenu de ces résultats, il est souhaitable de transformer chimiquement l'antigène 1 initialement cationique en une forme anionique qui ne pourra pas réagir avec le film anionique 11. Cette transformation s'effectue en ajoutant à cet antigène Méd-NR¹H, 35 de l'anhydride succinique selon la réaction chimique

(6). On obtient ainsi les formes acides modifiées de la nortriptyline et de la désipramine :



On notera qu'inversement, si on utilisait un antigène 1 anionique, on le traiterait de façon à l'avoir sous une forme cationique ne réagissant pas avec un film cationique.

Cette modification du médicament supprime l'interférence et en conséquence restaure le signal initial.

La figure 6 représente l'influence exercée par des concentrations croissantes de désipramine simple (courbe C1) et de désipramine modifiée pour se présenter sous une forme anionique (courbe C2), sur le pourcentage de signal électrique que fournit la désipramine marquée au cobalticinium. Cette dernière est présente selon une concentration de $2 \cdot 10^{-7}$ M. On constate qu'en présence de désipramine simple (courbe C1), cette dernière occupe des sites anioniques du film 11, de façon abusive et que la désipramine marquée au cobalticinium ne peut réagir complètement avec les sites du film 11. En conséquence, le pourcentage de signal électrique dû aux systèmes redox diminue. Au contraire, en présence du médicament modifié sous forme anionique (courbe C2), le pourcentage de signal n'est pas influencé. En outre, cette transformation chimique du médicament (antigène) a un second avantage. L'anticorps 5 (voir figure 1) présente une meilleure affinité pour l'antigène 1 lorsque celui-ci est sous forme anionique. En conséquence, on observe une meilleure sensibilité

de dosage.

Test d'interaction antigène marqué/sérum normal de lapin

En l'absence d'anticorps 5, il faut évaluer les interactions non spécifiques (liaisons protéiniques) du sérum avec les médicaments marqués, car le signal électrique correspond aux molécules n'interagissant pas. La figure 7 illustre l'influence du sérum normal de lapin sur l'accumulation dans l'électrode de l'antigène marqué, ici la nortriptyline marquée respectivement avec du cobalticinium (courbe C1), du pyrrolidinyloxy (courbe C2) et du ferrocène (courbe C3). Lorsque les médicaments sont marqués au cobalticinium, l'addition de sérum normal de lapin influe peu sur le signal électrique. C'est ce qu'illustre la courbe C1 où la concentration en médicament marqué est de $5.10^{-7}M$. Ceci résulte du caractère ionique, donc hydrophyle du marqueur. En revanche, lorsque ce médicament à une concentration de $10^{-6}M$ est marqué au pyrrolidinyloxy (courbe C2) ou au ferrocène (courbe C3), la chute du signal est plus importante en raison du caractère hydrophobe des médicaments marqués.

Test d'interaction anticorps/antigène marqué

Afin de vérifier que la réaction immunologique s'effectue correctement, il est nécessaire de montrer que les anticorps spécifiques 5 sont non seulement efficaces vis-à-vis des antigènes 1 seuls mais également vis-à-vis des antigènes marqués 7 et que la présence du système de marquage redox 3 ne modifie pas l'interaction avec l'anticorps. La figure 8 illustre le dosage de l'antisérum, c'est-à-dire du sérum contenant l'anticorps. (Il faut noter qu'avant le dosage immunologique proprement dit, il est nécessaire de déterminer la quantité d'anticorps que l'on devra ajouter par la suite lors des dosages pour être en

défaut d'anticorps).

On a ajouté à une solution contenant une quantité fixe d'antigènes marqués 7 (ici la désipramine marquée par du cobalticinium, concentration $2,7 \cdot 10^{-7}$ M) et dans laquelle plongeait l'électrode 13, des quantités croissantes d'anticorps 5. Cette addition d'anticorps fait chuter le signal électrique obtenu à l'électrode 13 en raison de l'appauvrissement de la solution en désipramine marquée libre, seule susceptible de pénétrer à l'intérieur du film polyanionique 11. En d'autres termes, les complexes anticorps/antigènes marqués 9 ne peuvent pas pénétrer dans ce film 11 et ne sont donc plus comptés, ce qui explique la diminution du pourcentage de signal électrique.

A titre d'exemple purement illustratif, la méthode de SCATCHARD a permis de déterminer la constante d'affinité de l'anticorps pour la désipramine marquée par le cobalticinium, et cette constante est égale à $5 \cdot 10^7$ M⁻¹.

Exemple de réalisation pratique du procédé selon l'invention

Comme dans tout dosage immunologique, avant d'entreprendre des déterminations de concentrations inconnues sur des échantillons biologiques, il est nécessaire d'établir une courbe d'étalonnage pour une gamme de concentrations données. Pour cela, cinq solutions ont été préparées, ce sont les suivantes :

- solution A : antigène marqué, ici de la désipramine marquée au cobalticinium, (concentration 10^{-5} M), dissoute dans de l'éthanol,
- solution B : antigène seul, modifié, c'est-à-dire la désipramine modifiée sous sa forme anionique et dissoute dans un tampon pH 7,4, (c'est-à-dire la solution E) concentration 10^{-5} M,
- solution C : sérum normal de lapin dilué

au 1/5 dans le tampon pH 7,4, (c'est-à-dire la solution E),

- solution D : anticorps, ici anti-sérum de lapin dilué au 1/5 dans le tampon pH 7,4, (c'est-à-dire la solution E),

- solution E : tampon pH 7,4 (2,7 g de Na_2HPO_4 , 12 H_2O +0,338 g NaH_2PO_4 , 2 H_2O +1,64 g NaCl +eau jusqu'à 500 ml).

Ensuite, on a préparé 3 tubes à essai dans lesquels on a effectué les mélanges suivants :

tube témoin (1) : solution A + solution C + solution E,

tube de zéro (2) : solution A + solution D + solution E,

tube étalon (3) : solution A + solution B + solution D + solution E.

Les solutions ont été homogénéisées, puis mises à incuber par exemple à 37°C pendant 60 minutes, de façon à atteindre l'équilibre de la réaction anticorps-antigène.

On les a ensuite transférées successivement dans la cellule d'électrolyse 21, elle-même plongée dans un bain thermostaté à 25°C. Les mesures sont effectuées en plongeant l'électrode 13 revêtue du film de Nafion 11 dans la cellule et en lui imposant une rotation de 600 tours par minute pendant 5 minutes (période d'accumulation des antigènes marqués libres). On effectue ensuite la mesure de voltammétrie à vague carrée.

L'obtention d'une courbe d'étalonnage fait intervenir trois mesures pour chaque point.

Tube 1 : Ag marqué + sérum → courant de pic I_1 ,

Tube 2 : Ag marqué + Ac → courant de pic I_2 ,

Tube 3 : Ag marqué + Ag seul + Ac → courant de pic I_3 .

Les résultats sont illustrés dans la figure 9 jointe. Dans le premier cas, tous les antigènes marqués peuvent se fixer sur l'électrode et se concentrer

dans le film de polymère, ce qui explique la valeur élevée du courant de pic I_1 . Dans le deuxième cas, une partie des antigènes marqués réagit avec les anticorps et seuls les antigènes marqués en excès se concentrent sur l'électrode. Ceci explique la faible valeur du courant de pic I_2 . Enfin, dans le troisième cas, la réaction de compétition entre les antigènes marqués et les antigènes non marqués, face aux anticorps a lieu. Une fraction des antigènes marqués libres moins importante que dans la deuxième mesure, se concentre sur l'électrode. Le courant de pic I_3 est donc une valeur intermédiaire entre I_1 et I_2 .

Le pourcentage de signal est défini par $(100 \cdot I_2)/I_1$ et le signal B/B_0 (%) est égal à $100(I_1 - I_3)/(I_1 - I_2)$.

A partir de ce type de résultats, on peut tracer une courbe d'étalonnage, telle que celle illustrée en figure 10. Cette courbe peut être utilisée pour l'analyse d'un échantillon contenant une quantité inconnue de désipramine modifiée (anionique).

Par ailleurs, le procédé selon l'invention permet d'envisager la réalisation de multidosages. En effet, comme illustré en figure 1, il est possible de doser en parallèle non seulement un antigène 1 mais également un antigène différent 1' et de faire réagir ce dernier en compétition avec un antigène 1' marqué par un système redox différent 3' face à des anticorps 5' spécifiques de l'antigène 1'. En effet, les dérivés du ferrocène, du cobalticinium, du pyrrolidinyloxy et du viologène présentent des pics d'intensité à des potentiels suffisamment différents les uns des autres pour que l'on puisse détecter une succession de pics sur une courbe de résultats.

Pour les médicaments 1 à 10 du tableau 1, les valeurs des potentiels correspondants aux pics d'intensité des différents systèmes redox sont données dans le tableau 2 ci-après.

Tableau 2

N°	Médicament marqué	Système de marquage	Potentiel de Pic (V)	Sensibilité i_p/C (A.l.mol ⁻¹)
1	nortriptyline	cobalticinium	- 1,13	51 — ACO
2	nortriptyline	pyrrolidinyloxy	+ 0,34	31 — accumulation à +0,7V 13 — accumulation à +0,8V
3	nortriptyline	viologène	- 0,78	*
4	amphétamine	ferrocène	+ 0,20	38 — accumulation à +0,7V 59 — accumulation à +0,5V
5	amphétamine	cobalticinium	- 1,13	78 — ACO
6	amphétamine	pyrrolidinyloxy	+ 0,34	18 — accumulation à +0,8V
7	désipramine	cobalticinium	- 1,13	51 — ACO
8	désipramine	pyrrolidinyloxy	+ 0,34	18 — accumulation à +0,8V
9	désipramine	viologène	- 0,78	*
10	biotine	cobalticinium	- 1,07	4 — ACO

Ag/AgCl ; Cl⁻ (0,05M)

* : aucune mesure de sensibilité effectuée

ACO : Accumulation en Circuit Ouvert

Ainsi, en utilisant au moins deux systèmes de marquage différents, on peut doser simultanément en une seule mesure, au moins deux médicaments présents dans un unique échantillon provenant d'un malade. On comprend bien qu'en toxicologie d'urgence, ce type de tests de dépistage peut permettre de dépister rapidement la présence et les concentrations de plusieurs médicaments d'usage courant.

La figure 11 illustre justement un triple dosage effectué sur un échantillon contenant simultanément de la nortriptyline marquée au cobalticinium, de l'amphétamine marquée au ferrocène et du diméthylviologène.

Les mesures ont été réalisées à une température de 25°C, avec une électrode revêtue de Nafion, tournant à 600 t/min, après 5 minutes d'accumulation à 0,6 V. Au cours de la mesure, on a balayé le potentiel entre + 0,6 V et - 1,4 V et l'on a observé trois pics numérotés respectivement P1, P2 et P3. Le pic P1 situé au voisinage de 0,19 V correspond au médicament marqué par le ferrocène, le pic P2 situé à -0,77 V correspond à la réduction du diméthyl viologène et le pic P3 situé à environ -1,11 V correspond à un médicament marqué par le cobalticinium.

En reportant les valeurs d'intensité obtenues sur une courbe d'étalonnage préétablie, il serait possible de déduire les concentrations des différents médicaments. Ici la concentration de la nortriptyline marquée au Cc^+ était de $5,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$, celle de l'amphétamine marquée au Fe de $3,45 \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$ et celle du méthyl viologène de $5,2 \cdot 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$.

L'invention concerne également un kit de dosage utilisant le principe du procédé qui vient d'être décrit. Ce kit est schématisé en figure 12.

Il comprend un contenant 40 qui contient

au moins un type de complexe anticorps 5, 5'-antigène marqué par le système redox ionique 3, 3'. Ce complexe peut être fixé ou non sur le contenant. L'antigène correspond à celui que l'on souhaite doser.

5 Sur cette figure 12, le contenant 40 revêt la forme d'un tube à essai et permet de réaliser une analyse séquentielle. Toutefois, il est bien évident que ce contenant pourrait également se présenter sous forme d'une plaque de dosage multi-puits. Par ailleurs,
10 il est également possible d'effectuer une analyse en flux continu et dans ce cas, le complexe Ac/Ag marqué 9, 9' est fixé sur des billes de natures diverses qui jouent le rôle de support 40. Ces différents types de contenants ou de supports sont donnés à titre d'exemple illustratifs. Ils sont à usage unique.

Le kit de dosage selon l'invention comprend également une électrode 13 revêtue d'un film 11 polyanionique, de polarité contraire à celle du système 3, 3' et avantageusement polyanionique. De façon avantageuse, ce film 11 est le film polyanionique de Nafion (marque déposée) précédemment décrit et le système de marquage redox 3, 3' est de nature cationique ou procationique, tels que ceux qui ont été précédemment décrits. On pourrait également utiliser un kit comprenant des complexes Ac/Ag marqués par un système redox anionique ou proanionique et une électrode revêtue d'un film polycationique.

Enfin, le kit peut comprendre éventuellement des tubes à essais 42, 44 contenant des échantillons standard de quantités connues d'antigène à doser 1' et 1 respectivement. Ces tubes permettent de réaliser la courbe d'étalonnage selon le principe précédemment décrit. L'utilisateur peut également préparer lui-même ses échantillons standard.

35 Lors de l'utilisation de ce kit de dosage,

on verse l'échantillon biologique 23, contenant les antigènes 1, 1', éventuellement traités pour se présenter sous forme anionique, dans le tube 40. La réaction de compétition a lieu et certains antigènes 1, 1' vont déloger les antigènes marqués 7, 7' pour se fixer à leur place sur les anticorps 5, 5'. La suite de la réaction est identique à ce qui a été décrit précédemment pour le procédé, notamment en ce qui concerne les moyens de détection électrochimique et l'analyse des résultats sur la base de la courbe d'étalonnage.

REVENDICATIONS

1. Antigène marqué par un système redox dont l'une des formes est ionique, destiné à être utilisé
5 dans un procédé de dosage immunologique avec détection électrochimique, de cet antigène ou dans un kit de dosage immunologique de cet antigène, caractérisé en ce que l'antigène marqué est choisi parmi la
10 nortriptyline marquée à l'hexafluorophosphate de l'acide carboxylique du cobalticinium, au pyrrolidinyloxy ou au dibromure d'éthyl alkyl viologène ; l'amphétamine marquée au tétrafluoroborate de l'acide carboxylique du cobalticinium ou au pyrrolidinyloxy, la désipramine
15 marquée à l'hexafluorophosphate de l'acide carboxylique du cobalticinium, au pyrrolidinyloxy ou au dibromure d'éthyl alkyl viologène ; ou la biotine marquée au tétraphénylborate de l'acide carboxylique du cobalticinium.

2. Procédé de dosage immunologique avec détection électrochimique, d'au moins un antigène comprenant
20 au moins un groupement fonctionnel, comprenant les étapes consistant à :

- préparer une solution à analyser comprenant une solution aqueuse tamponnée au pH physiologique
25 et un échantillon biologique (23) contenant au moins l'un des antigènes à doser (1, 1'),

- mettre en compétition au moins l'un desdits antigènes à doser (1, 1') avec le même antigène (7, 7') marqué par un système redox dont l'une des formes
30 est ionique (3, 3'), face à un anticorps (5, 5') spécifique desdits antigènes (1, 7 ; 1', 7') et présent en quantité limitée, ce procédé étant caractérisé en ce qu'il consiste en outre à :

- collecter sur une électrode (13) comprenant
35 un composé polyionique (11) de polarité contraire à

celle du système redox (3, 3'), les antigènes marqués (7, 7') non liés à l'anticorps spécifique (5, 5'), de façon que ces antigènes marqués (7, 7') pénètrent à l'intérieur dudit composé polyionique (11) et se concentrent dans celui-ci pendant une période d'accumulation,

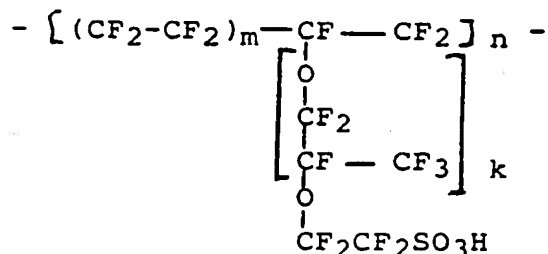
- mesurer le signal fourni par ladite électrode (13) à l'issue de la période d'accumulation, grâce à des moyens de détection électrochimique (15), reliés à cette électrode.

3. Procédé de dosage immunologique selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'électrode (13) est revêtue d'un film polyionique (11).

4. Procédé de dosage immunologique selon la revendication 3, caractérisé en ce que le système redox (3, 3') est cationique ou procationique et en ce que le film (11) recouvrant l'électrode (13) est polyanionique.

5. Procédé de dosage immunologique selon la revendication 4, caractérisé en ce que le film polyanionique (11) recouvrant l'électrode (13) est un polymère perfluoré, porteur de sites anioniques, au pH physiologique.

6. Procédé de dosage immunologique selon la revendication 5, caractérisé en ce que le film polyanionique (11) recouvrant l'électrode (13) est un polymère perfluoré de formule :



dans laquelle m est compris entre 5 et 13,5, n vaut

environ 1000 et k est un entier compris entre 1 et 3.

7. Procédé de dosage immunologique selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'antigène (1, 1' ; 7, 7') est une molécule comprenant au moins une fonction amine primaire ou secondaire ou une fonction carboxylique.

8. Procédé de dosage immunologique selon la revendication 2 ou 7, caractérisé en ce que les antigènes (1, 1') à doser sont choisis parmi :

- les antidépresseurs tricycliques tels que la désipramine, l'imipramine, la nortriptyline, l'amitriptyline, la clomipramine, la maprotiline et atypiques tels que la nomifensine, la miansérine, l'amineptine, la zimélidine,

- les antiépileptiques tels que les dérivés des barbituriques, notamment le phénobarbital, le méphobarbital, ou tels que les hydantoïnes, notamment la phénytoïne, la méphénytoïne, la carbamazépine et l'acide valproïque,

- les tranquillisants dérivés des benzodiazépines, notamment le diazépam, le nitrazépam,

- les neuroleptiques tricycliques tels que la chlorpromazine et la trifluopérazine,

- les neuroleptiques tels que l'halopéridol, le fluospirilène,

- les antitumoraux tels que le méthotrexate, le 5-fluoro-uracile et l'azathioprine,

- les vitamines telles que la biotine,

- les alcaloïdes,

- les amphétamines,

- les antibiotiques,

- les cardiotoniques et les antiarythmiques,

- les neurotransmetteurs et leurs dérivés,

- les antihistaminiques,

- les immunosuppresseurs tels que la cyclosporine,
- la théophylline, ou
- les pesticides.

5 9. Procédé de dosage immunologique selon la revendication 4, caractérisé en ce que le système redox de marquage (3, 3') est choisi parmi les dérivés du ferrocène, du cobalticinium, du pyrrolidinyloxy ou du viologène.

10 10. Procédé de dosage immunologique selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'avant d'être mis en compétition, l'antigène à doser (1, 1') est traité de façon à ce qu'il se présente sous une forme ionique de même polarité que celle du film (11) recou-

15 vrant l'électrode (13).

 11. Procédé de dosage immunologique selon les revendications 4 et 10, caractérisé en ce qu'avant d'être mis en compétition, l'antigène à doser (1, 1') est traité par l'anhydride succinique de façon à prendre

20 une forme anionique.

 12. Procédé de dosage immunologique selon la revendication 2, caractérisé en ce que les moyens de détection électrochimique (15) sont choisis parmi l'ampérométrie, la coulométrie, la voltampérométrie

25 ou la voltammétrie à vague carrée.

 13. Procédé de dosage immunologique selon les revendications 4 et 6, caractérisé en ce que les moyens de détection sont la voltammétrie à vague carrée.

 14. Procédé de dosage immunologique selon la revendication 4, caractérisé en ce que le système redox (3, 3') est procationique et en ce que l'électrode (13) est maintenue à un potentiel positif pendant la période d'accumulation.

30

 15. Procédé de dosage immunologique selon la revendication 3, caractérisé en ce que le système

35

redox (3, 3') est cationique et en ce que l'électrode (13) est maintenue en circuit ouvert pendant la période d'accumulation.

16. Procédé de dosage immunologique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'électrode (13) revêtue du film polyionique (11) est à usage unique.

17. Kit de dosage immunologique d'au moins un antigène (1, 1') comprenant au moins un groupement fonctionnel, caractérisée en ce qu'il comprend :

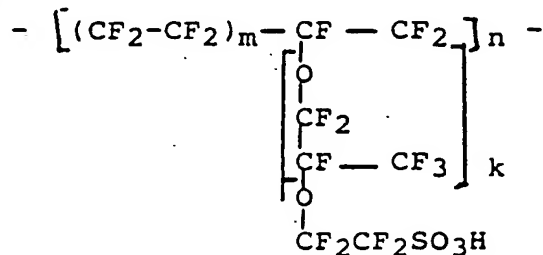
- au moins un support ou un contenant (40) possédant au moins un type de complexe (9, 9') anticorps (5)-antigène (7, 7') marqué par un système redox dont l'une des formes est ionique (3, 3'), l'antigène (7, 7') correspondant à celui (1, 1') que l'on souhaite doser et

- une électrode (13) comprenant un composé polyionique (11) de polarité contraire à celle dudit système redox (3, 3').

18. Kit de dosage selon la revendication 17, caractérisé en ce que l'électrode (13) est revêtue d'un film polyionique (11).

19. Kit de dosage selon la revendication 18, caractérisé en ce que le système de marquage redox est cationique ou procationique et en ce que le film (11) recouvrant l'électrode (13) est polyanionique.

20. Kit de dosage selon la revendication 19, caractérisé en ce que le film polyanionique (11) recouvrant l'électrode (13) est un polymère perfluoré de formule :



dans laquelle m est compris entre 5 et 13,5, n vaut environ 1000 et k est un entier compris entre 1 et 3.

5 21. Kit de dosage selon la revendication 17, 18, 19 ou 20, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une série de tubes échantillons (42, 44) contenant des quantités connues d'au moins un des antigènes (1, 1') à doser, afin de permettre la réalisation d'une courbe d'échantillonnage.

10 22. Kit de dosage selon la revendication 17, caractérisé en ce que le système redox de marquage (3, 3') est choisi parmi les dérivés du ferrocène, du cobalticinium, du pyrrolidinyloxy ou du viologène.

15 23. Kit de dosage selon la revendication 17, caractérisé en ce que l'antigène (1, 1' ; 7, 7') est une molécule comprenant au moins une fonction amine primaire ou secondaire ou une fonction carboxylique.

1/8

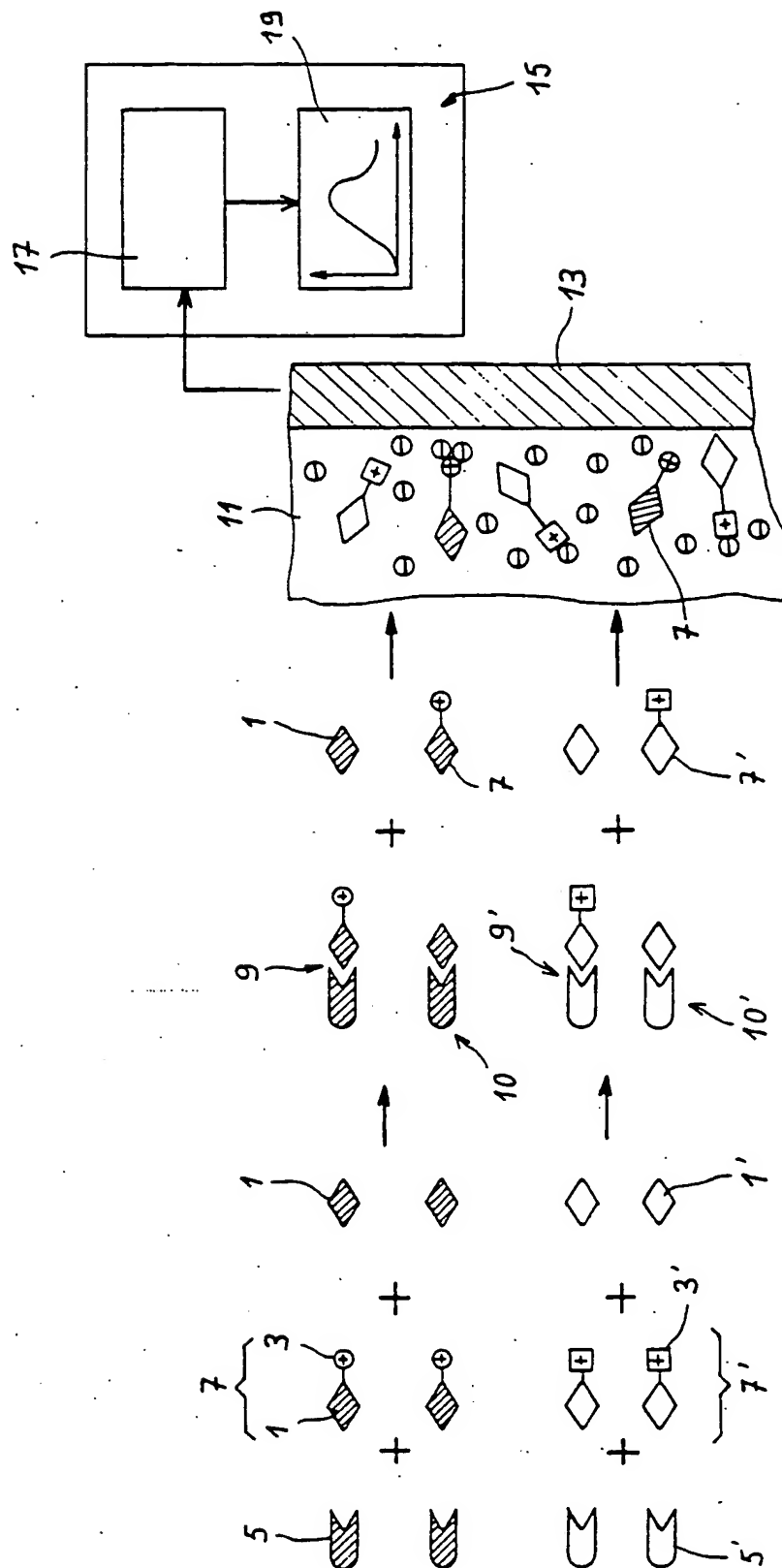


FIG.1

2/8

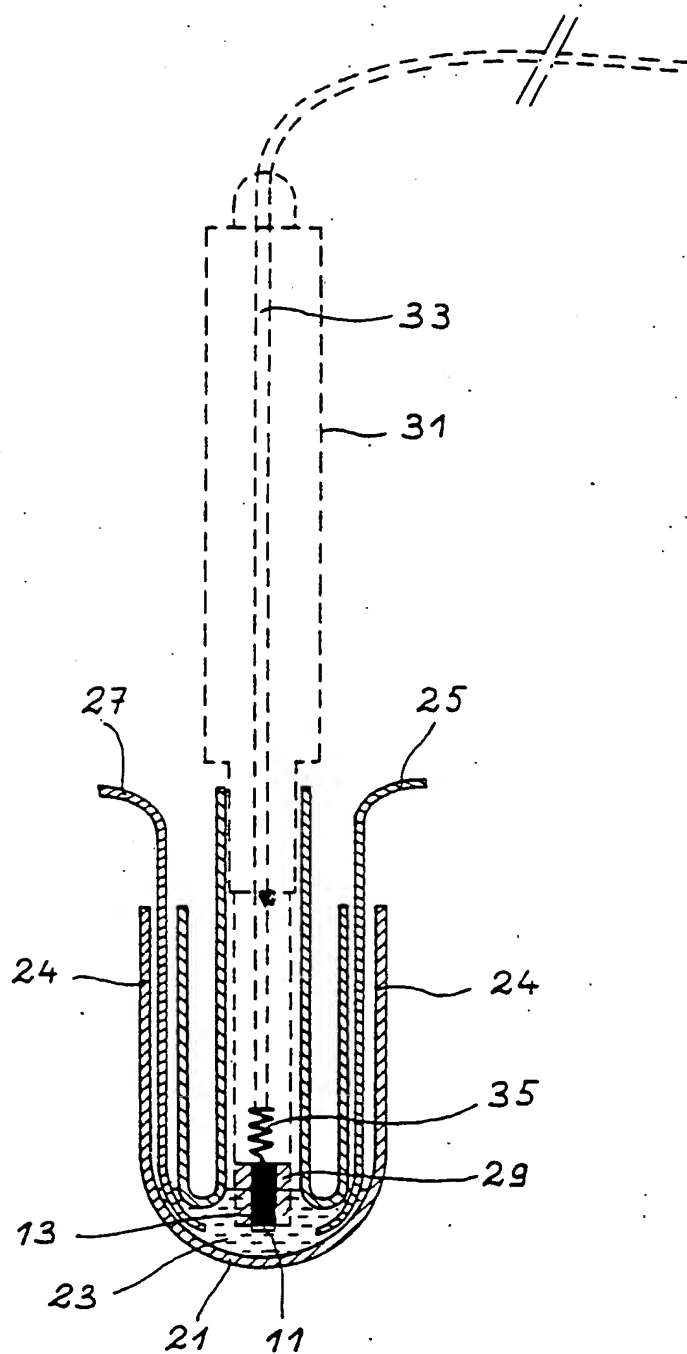


FIG. 2

3/8

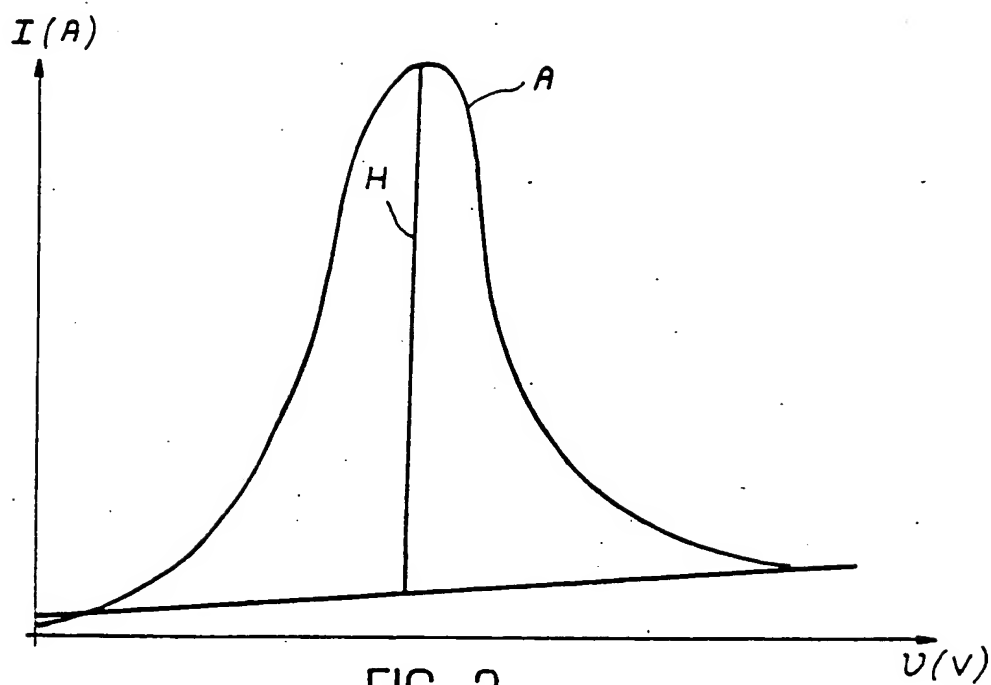


FIG. 3

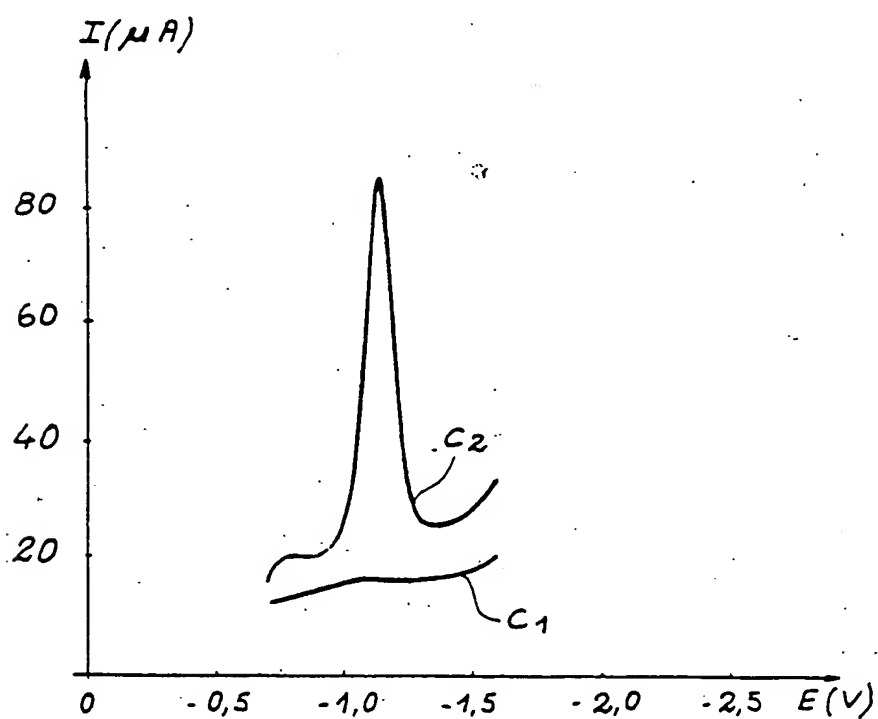


FIG. 4

4/8

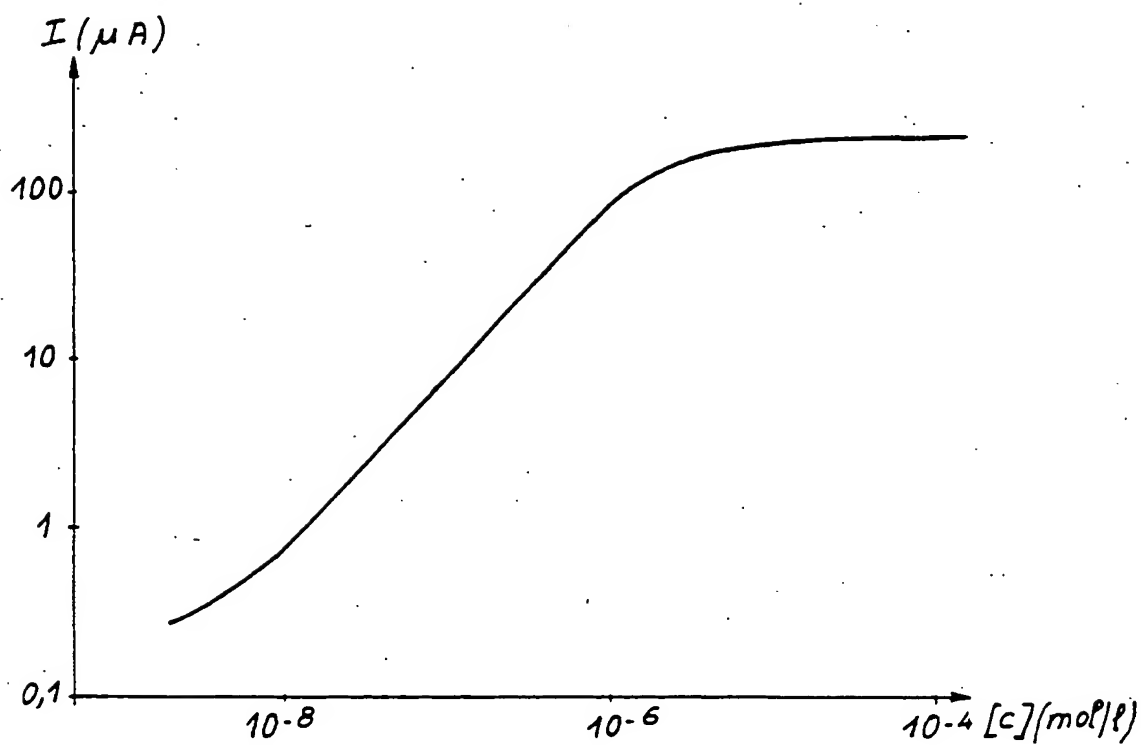


FIG. 5

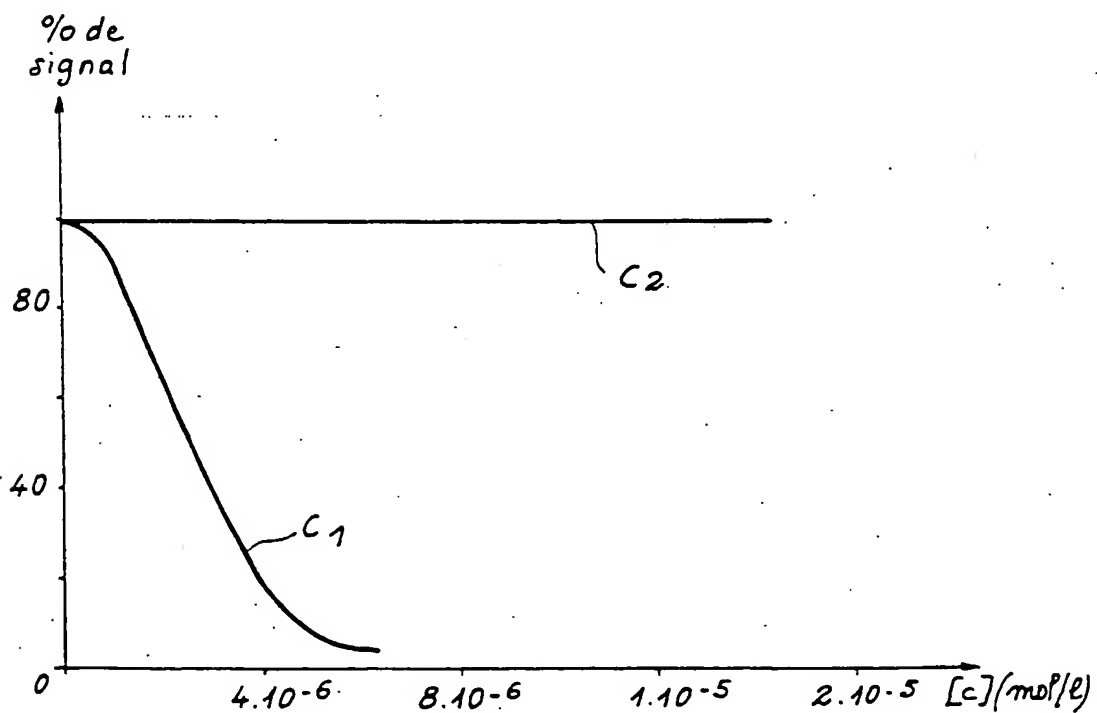


FIG. 6

5/8

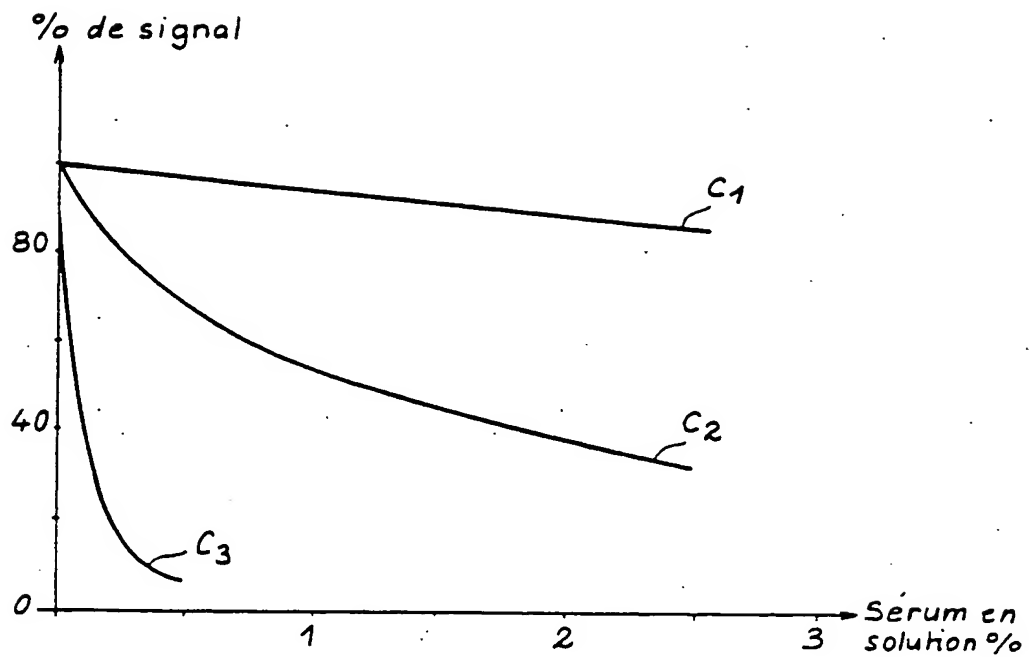


FIG. 7

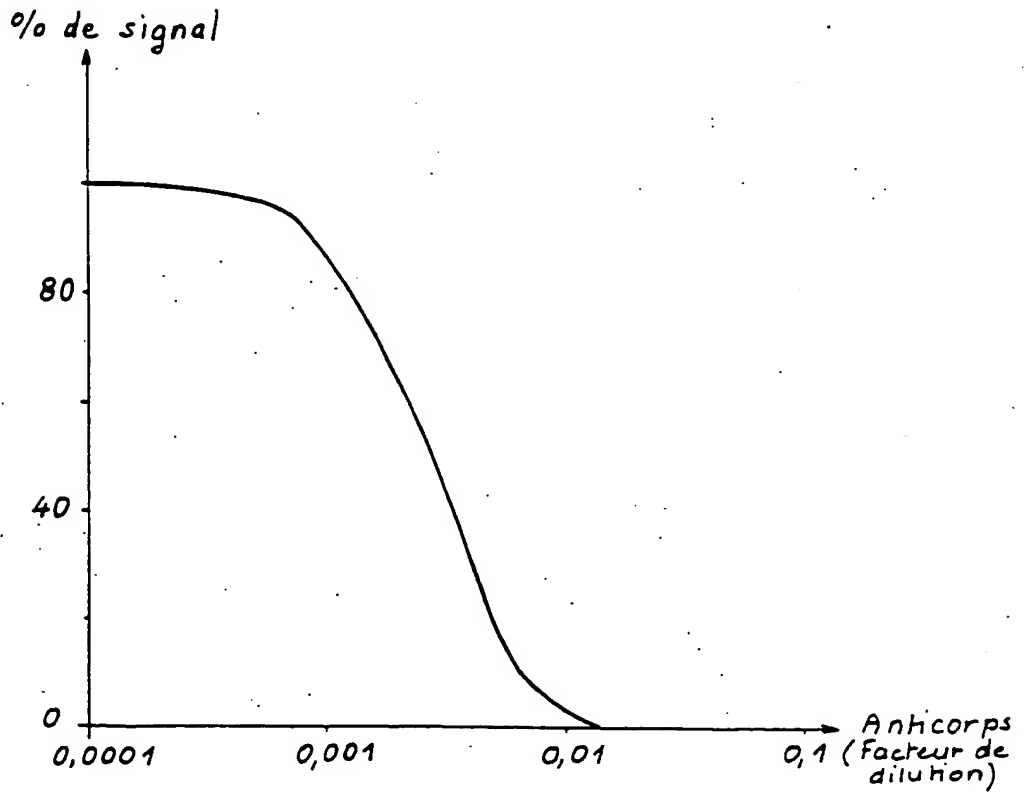


FIG. 8

6/8

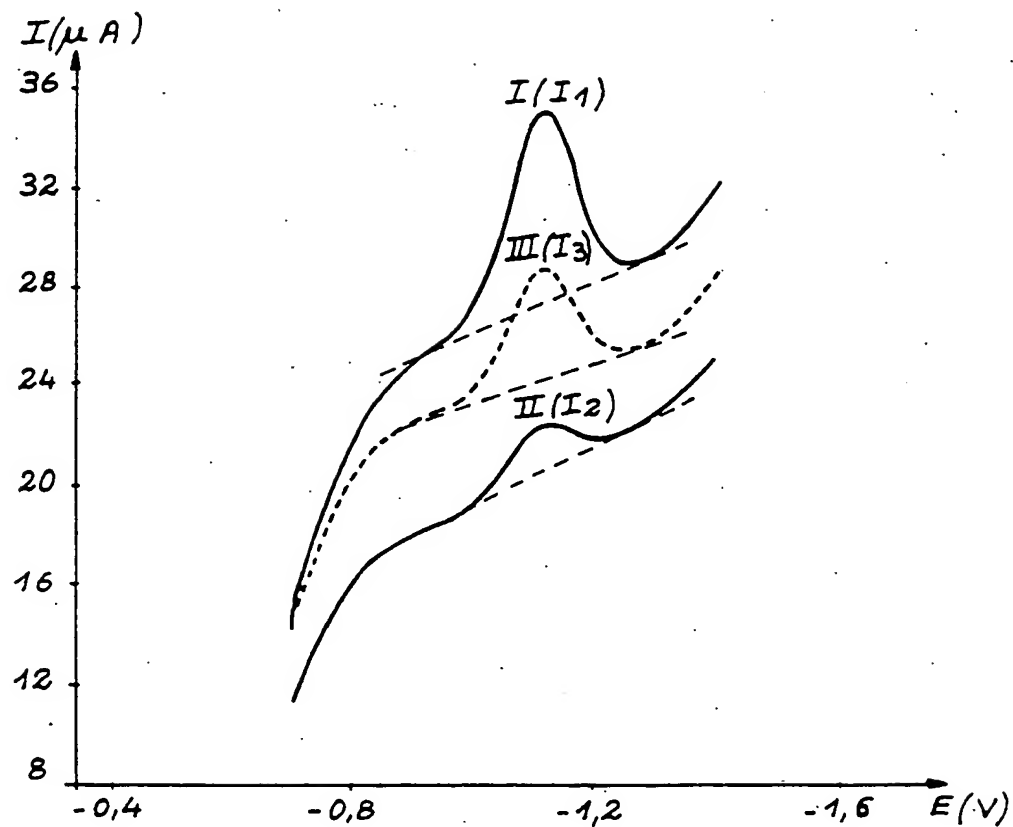


FIG. 9

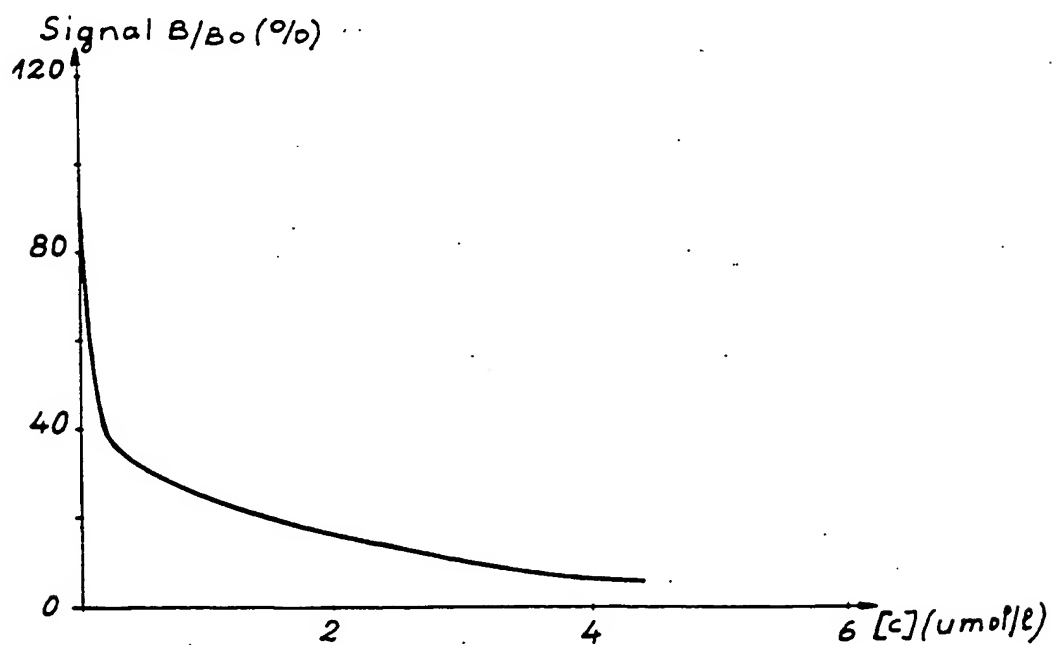


FIG. 10

7/8

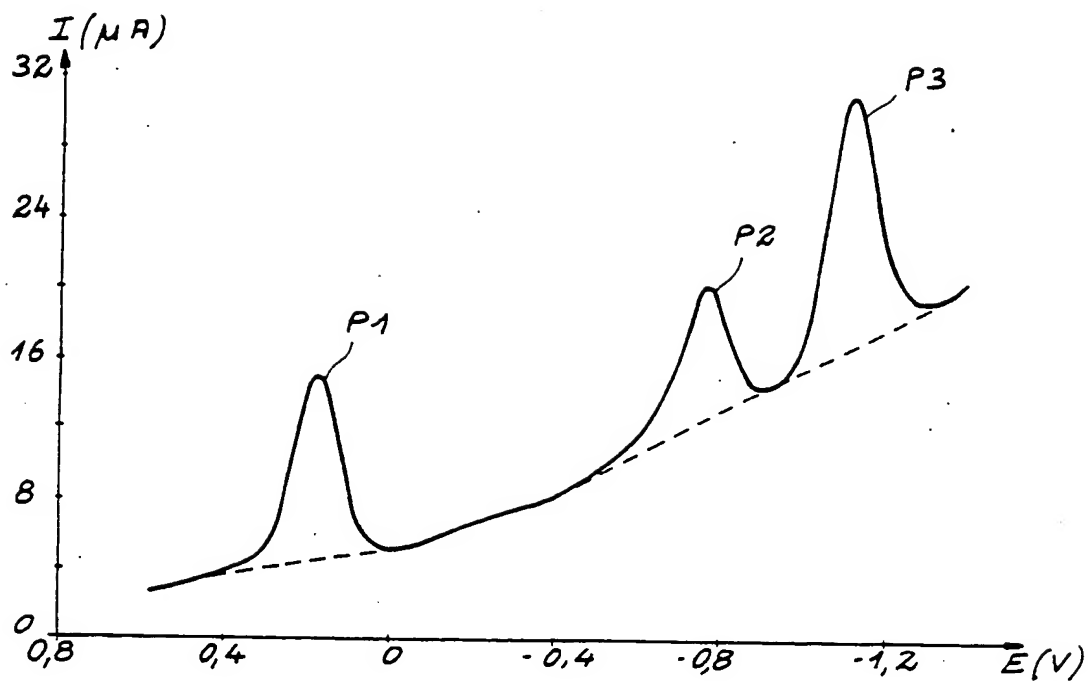


FIG. 11

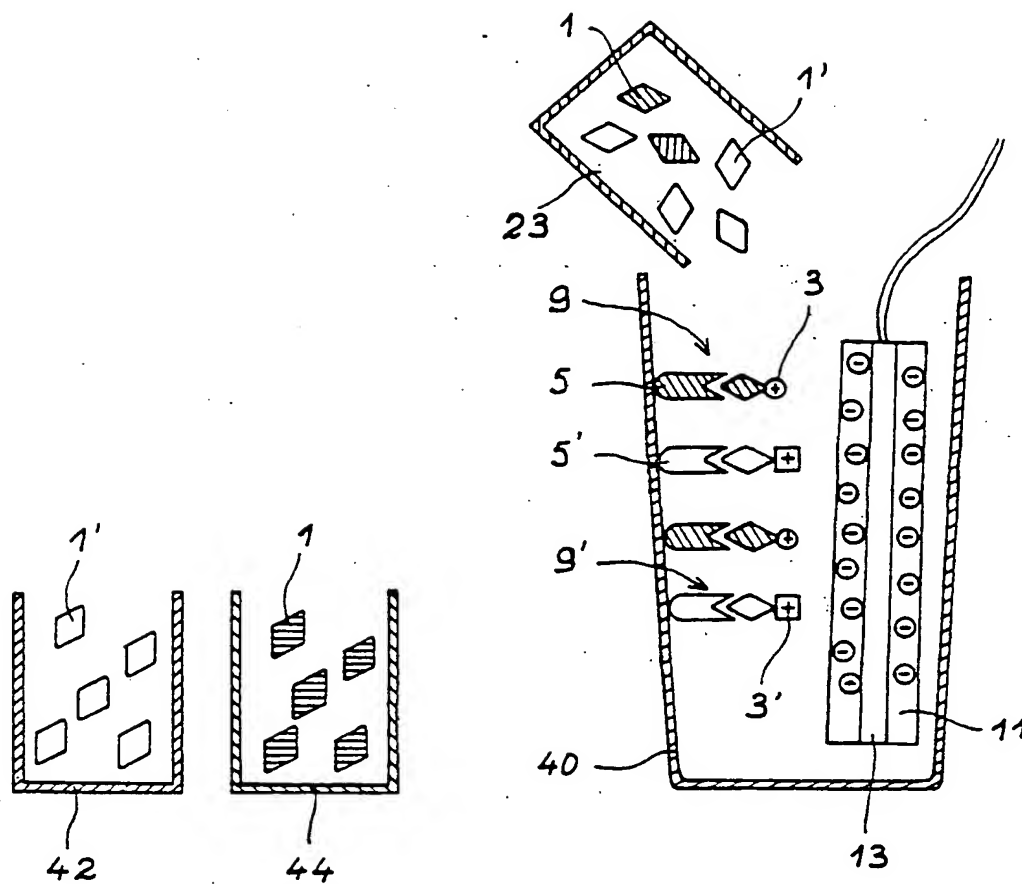


FIG. 12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00561

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int.Cl.5 G01N33/532; G01N33/536 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl.5 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP, A, 0 241 309 (MEDISENSE INC) 14 October 1987 cited in the application see the whole document	2-4,7-9, 12,14,15
Y		5,6,13
A		1,17-23
Y	----- DATABASE WPIL Week 9211, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 92-085014 & JP, A, 4 028 165 (KOMATSU KK) 30 January 1992 see abstract	5,6
Y	---- US, A, 4 233 144 (PACE ET AL) 11 November 1980 see the whole document	13
A	---	1,2,7,9,12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 7 September 1993 (07.09.93)		Date of mailing of the international search report 28 September 1993 (28.09.93)
Name and mailing address of the ISA/ EUROPEAN PATENT OFFICE Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00561

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ANALYTICAL CHEMISTRY Vol. 57, No. 12, October 1985, WASHINGTON DC pages 1321A-1331A HEINEMAN ET AL. 'Strategies for electrochemical immunoassay' see abstract	1,2
A	EP, A, 0 107 134 (MILES LABORATORIES INC) 2 May 1984 see abstract	1
A	JOURNAL OF THE ELECTROCHEMICAL SOCIETY Vol. 130, No. 3, March 1983, BALTIMORE, MD pages 613-621 HENNING ET AL. 'XI. Electrochemical behaviour of polymer electrodes produced by incorporation of tetrathiafulvalenium in a polyelectrolyte (Nafion) matrix' see abstract	6
A	EP, A, 0 167 248 (SERONO DIAGNOSTICS LIMITED) 8 January 1986 cited in the application	
A	EP, A, 0125 139 (GENETICS INTERNATIONAL INC) 14 November 1984	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9300561
SA 75448

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

07/09/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0241309	14-10-87	JP-A- 62294958	22-12-87
US-A-4233144	11-11-80	None	
EP-A-0107134	02-05-84	US-A- 4495281	22-01-85
		AU-B- 554345	14-08-86
		AU-A- 1787983	03-05-84
		CA-A- 1240986	23-08-88
		JP-B- 2031347	12-07-90
		JP-A- 59132362	30-07-84
EP-A-0167248	08-01-86	AU-B- 597562	07-06-90
		AU-A- 4241185	09-01-86
		CA-A- 1268520	01-05-90
		US-A- 4945045	31-07-90
EP-A-0125139	14-11-84	AU-B- 564494	13-08-87
		AU-A- 2775184	31-01-85
		AU-B- 564495	13-08-87
		AU-A- 2775284	31-01-85
		AU-B- 569076	21-01-88
		AU-A- 2775384	08-11-84
		AU-B- 580257	12-01-89
		AU-A- 2775484	08-11-84
		CA-A- 1219040	10-03-87
		CA-A- 1223638	30-06-87
		CA-A- 1218704	03-03-87
		CA-A- 1220818	21-04-87
		EP-A- 0125867	21-11-84
		EP-A, B 0125136	14-11-84
		EP-A, B 0125137	14-11-84
		JP-A- 60017360	29-01-85
		JP-A- 60017346	29-01-85
		JP-A- 60017347	29-01-85
		JP-A- 60017345	29-01-85
		US-A- 4758323	19-07-88
		US-A- 4711245	08-12-87
		AU-B- 583258	27-04-89
		AU-A- 3832985	26-06-85
		CA-A- 1223639	30-06-87

EPO FORM P07M

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

FR 9300561
SA 75448

07/09/93

WFO FORM 607M

BNSDOCID: <WO 9325907A1>

I. CLASSEMENT DE L'INVENTION (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) ⁷		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
CIB 5 G01N33/532; G01N33/536		
II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée ⁸		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	G01N	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté		
III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁰		
Catégorie ⁹	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents ¹¹	No. des revendications visées ¹⁴
X	EP,A,0 241 309 (MEDISENSE INC) 14 Octobre 1987 cité dans la demande voir le document en entier	2-4,7-9, 12,14,15
Y	---	5,6,13 1,17-23
A		
Y	DATABASE WPIL Week 9211, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 92-085014 & JP,A,4 028 165 (KOMATSU KK) 30 Janvier 1992 voir abrégé	5,6

	---/---	
<p>* Catégories spéciales de documents cités:¹¹</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> <p>"T" document antérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"A" document qui fait partie de la même famille de brevets</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
07 SEPTEMBRE 1993	28.09.93	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	CEDER O.	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS ¹⁴		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie ^o	Identification des documents cités, ¹⁵ avec indication, si nécessaire des passages pertinents ¹⁷	No. des revendications visées ¹⁸
Y	US,A,4 233 144 (PACE ET AL.) 11 Novembre 1980 voir le document en entier	13
A	---	1,2,7,9, 12
A	ANALYTICAL CHEMISTRY vol. 57, no. 12, Octobre 1985, WASHINGTON, DC pages 1321A - 1331A HEINEMAN ET AL. 'Strategies for electrochemical immunoassay' voir abrégé	1,2
A	---	
A	EP,A,0 107 134 (MILES LABORATORIES INC) 2 Mai 1984 voir abrégé	1
A	---	
A	JOURNAL OF THE ELECTROCHEMICAL SOCIETY vol. 130, no. 3, Mars 1983, BALTIMORE, MD pages 613 - 621 HENNING ET AL. 'XI. Electrochemical behaviour of polymer electrodes produced by incorporation of tetrathiafulvalenium in a polyelectrolyte (Nafion) matrix' voir abrégé	6
A	---	
A	EP,A,0 167 248 (SERONO DIAGNOSTICS LIMITED) 8 Janvier 1986 cité dans la demande	
A	---	
A	EP,A,0 125 139 (GENETICS INTERNATIONAL INC) 14 Novembre 1984	

Formulaire PCT/ISA/210 (feuille supplémentaire) (Octobre 1981)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9300561
SA 75448

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

07/09/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0241309	14-10-87	JP-A- 62294958	22-12-87
US-A-4233144	11-11-80	Aucun	
EP-A-0107134	02-05-84	US-A- 4495281	22-01-85
		AU-B- 554345	14-08-86
		AU-A- 1787983	03-05-84
		CA-A- 1240986	23-08-88
		JP-B- 2031347	12-07-90
		JP-A- 59132362	30-07-84
EP-A-0167248	08-01-86	AU-B- 597562	07-06-90
		AU-A- 4241185	09-01-86
		CA-A- 1268520	01-05-90
		US-A- 4945045	31-07-90
EP-A-0125139	14-11-84	AU-B- 564494	13-08-87
		AU-A- 2775184	31-01-85
		AU-B- 564495	13-08-87
		AU-A- 2775284	31-01-85
		AU-B- 569076	21-01-88
		AU-A- 2775384	08-11-84
		AU-B- 580257	12-01-89
		AU-A- 2775484	08-11-84
		CA-A- 1219040	10-03-87
		CA-A- 1223638	30-06-87
		CA-A- 1218704	03-03-87
		CA-A- 1220818	21-04-87
		EP-A- 0125867	21-11-84
		EP-A,B 0125136	14-11-84
		EP-A,B 0125137	14-11-84
		JP-A- 60017360	29-01-85
		JP-A- 60017346	29-01-85
		JP-A- 60017347	29-01-85
		JP-A- 60017345	29-01-85
		US-A- 4758323	19-07-88
		US-A- 4711245	08-12-87
		AU-B- 583258	27-04-89
		AU-A- 3832985	26-06-85
		CA-A- 1223639	30-06-87

EPO FORM P0471

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9300561
SA 75448

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.
Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

07/09/93

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0125139		EP-A, B 0149339	24-07-85
		WO-A- 8502627	20-06-85
		JP-T- 61500706	17-04-86
		US-A- 4840893	20-06-89
		AU-B- 572138	05-05-88
		CA-A- 1226036	25-08-87
		DE-A- 3485554	16-04-92
		EP-A, B 0127958	12-12-84
		EP-A- 0351891	24-01-90
		EP-A- 0351892	24-01-90

EPO FORM P002

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.